(11)Publication number:

08-085704

(43) Date of publication of application: 02.04.1996

(21)Application number: 07-206700

(71)Applicant: SEIKAGAKU KOGYO CO

LTD

(22)Date of filing:

21.07.1995

(72)Inventor: MIURA RIYUU

YAMAGATA SADAKO YAMAGATA TATSUYA

(30)Priority

Priority date: 22.07.1994 Priority number: 06191285 Priority country: JP

(54)GLYCOSAMINOGLYCAN DERIVATIVE, **GEL** OF **ACRYLAMIDE** COPOLYMER OF THE DERIVATIVE, AND ENZYME IDENTIFICATION **METHOD**

(57) Abstract:

PURPOSE: To obtain specific glycosaminoglycan derivative which readily copolymerizes with acrylamide to give a copolymer gel useful in the identification of a glycosaminoglycan hydrolase.

CONSTITUTION: This glycosaminoglycan derivative has a structure comprising a residue (a) having a reduced terminal saccharide and an allyl-terminated compound bonded to the saccharide through an aminoalkyl or acid amide bond. It is represented by the formula (wherein GAG-R' is the residue (a), and R' is CH2 or CO). The glycosaminoglycan is preferably

selected from among hyaluronic acid, chondroitin, chondroitin sulfate, dermatan sulfate, heparin, keratan sulfate, and heparan sulfate.

BEST AVAILABLE COPY

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出顧公開發号

特開平8-85704

(43)公開日 平成8年(1995)4月2日

(51) Int.CL⁶ CO8B 37/00 鐵別配号 庁内整理番号 G 7433-4C

技術表示的所

37/08

Z 7433-4C

37/10

7433-4C

C08F 218/14

MKZ

G01N 27/26

PΙ

315

審査商求 未商求 請求項の数18 FD (全 10 頁) 最終頁に続く

(21)出顧番号

特顯平7-208700

(22)出駐日

平成7年(1995) 7月21日

(31)優先権主張答号 特閣平6-191285

平6 (1994) 7月22日

(32)優先日 (33)優先權主張国

日本 (JP)

(71)出廢人 000195524

生化学工资保式会社

京京都中央区日本橋本町2丁目1巻5号

(72)発明者 三浦 りゅう

神奈川県相模原市西大招1丁目23巻10号

コスモハイツ2-R

(72) 発明者 山形 貞子

神奈川県横浜市縁区大丸10-4-104

(72) 発明者 山形 遠也

神奈川県横浜市緑区大丸10-4-104

(74)代理人 弁理士 長谷川 一 (外2名)

(54) 【発明の名称】 グリコサミノグリカン誘導体、談誘導体のアクリルアミド共宣合体ゲル及び酵菜岡定法

(57)【要約】

【構成】グリコサミノグリカンの還元末總糖にアミノア ルキル結合または酸アミド結合により末端にアリル基を 有する化合物を結合させてなるグリコサミノグリカン誘 導体、該誘導体及びアクリルアミドを含む共重合体から なるグリコサミノグリカン結合ポリアクリルアミドゲル 並びにグリコサミノグリカン分解酵素含有検体を、該グ ルを担体として電気泳動に付し、泳助後の担体を酵素反 応させた後、担体に結合固定されていたグリコサミノグ リカンの分解を検出する、検体中のグリコサミノグリカ ン分解酵素の分別・同定法。

【効果】新規なグリコサミノグリカン誘導体とアクリル アミドの共産合体ゲルによる電気泳動では、分子量が小 さいためにゲルに固定が困難であったコンドロイチン硫 酸のようなグリコサミノグリカンがゲルに固定している ので、コンドロイチナーゼのようなグリコサミノグリカ ン分解酵素の同定を可能にする。

特開平8-85704

【特許請求の範囲】

【鶴水項1】グリコサミノグリカンの還元末總鑑にアミ ノアルキル結合または酸アミド結合を介して糖との結合 に関与しない末端がアリル基である化合物が結合してい るグリコサミノグリカン誘導体。

【韻求項2】グリコサミノグリカンの還元末總體を還元 及び部分酸化することにより形成したアルデヒド苺、ま たは該還元末端鏡を酸化及び脱水関環することにより形 成したラクトンと、アミノアルキル結合または酸アミド 結合により末端にアリル甚を有する化合物が結合してい 10 7 - ジアミノナフタレン、リジン或いはオルニチンであ る請求項1記載のグリコサミノグリカン誘導体。

【間求項3】グリコサミノグリカンの還元末總體を還元 及び部分酸化することにより形成したアルデヒド基、ま たは酸還元末端盤を酸化及び脱水閉環することにより形 成したラクトンに、少なくとも2個のアミノ基を有する スペーサー化合物をアミノアルキル結合または酸アミド 結合させ、末端がアリル基で、他端がアミノ基と結合し 得る官能基であり、結合鎖中に昇程原子を含有していて 6良い炭化水素化合物を、酸スペーサー化合物のアミノ 基に結合させてなる請求項1記載のグリコサミノグリカ 20 ン誘導体。

【請求項4】スペーサー化合物は、一般式(1)で示さ れることよりなる請求項3記載のグリコサミノグリカン 躁烦体。

* (CH₂)_x-CH (COOH) -、フェニレン苺. ナフ チレン基を表し、R=H、炭素数1~4のアルキル基、 x=3または4. m=1~10、n=1~10. 但しm +n≦10を意味する。)。

【館求項5】スペーサー化合物は、エチレンジアミン、 1、3-プロパンジアミン、1,4-ブタンジアミン、 1、6-ヘキサンジアミン、1、6-ジアミノ-2-エ チルヘキサン、1、4ージアミノベンゼン、1、4ージ アミノナフタレン、1,5-ジアミノナフタレン、2, ることよりなる語求項3記載のグリコサミノグリカン誘 導体.

【請求項6】スペーサー化合物がエチレンジアミンであ ることよりなる語求項3記載のグリコサミノグリカン誘

【請求項7】炭化水素化合物のアミノ葉と結合し得る官 能益は、エポキシ基、ハロゲン原子。ヒドロキシル基成 いはカルボキシル基であることよりなる請求項3記載の グリコサミノグリカン誘導体。

【語求項8】炭化水素化合物が、アリルグリシジルエー テルであることよりなる請求項3記載のグリコサミノグ リカン誘導体。

【詰求項9】一般式(2)で示されるグリコサミノグリ カン誘導体。

[(t2)

 $\cdots \cdots (2)$

(式中、GAG-R -は、還元末端が修飾されたグリ コサミノグリカン残基を表し、R はCH、またはCO を表す。)

【論求項10】アリル基を有する化合物は、アリルアミ ン、Nーアリルチオウレア或いはN-アリルウレアであ ることよりなる語求項1又は2記載のグリコサミノグリ カン誘連体。

【韻求項11】グリコサミノグリカンがヒアルロン酸、 コンドロイチン、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫 一般、ヘパリン、ケラタン確散及びヘパラン硫酸から選ば れることを特徴とする請求項1乃至3及び9のいずれか に記載のグリコサミノグリカン誘導体。

誘導体及びアクリルアミドを構成単量体として含む共産 台体からなるグリコサミノグリカン結合ポリアクリルア ミドゲル。

【詰求項13】グリコサミノグリカン誘導体が詰求項9

2記載のグリコサミノグリカン結合ポリアクリルアミド

【語求項14】構成単置体として、更にN. N'-メチ レンピスアクリルアミドを含むことよりなる鯖求項12 記載のグリコサミノグリカン結合ポリアクリルアミドゲ

【館求項15】グリコサミノグリカンがヒアルロン酸、 コンドロイチン、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫 融、ヘパリン、ケラタン硫酸及びヘパラン硫酸から選ば れることを特徴とする請求項12万至14のいずれかに 記載のグリコサミノグリカン結合ポリアクリルアミドゲ

【詰求項16】詰求項12乃至15のいずれかに記載の グリコサミノグリカン結合ポリアクリルアミドゲルより なるゲル電気泳動用担体。

【詰求項17】グリコサミノグリカン分解酵素含有検体 を、 請求項12万至15のいずれかに記載のグリコサミ に記載の一般式(2)で示されることよりなる詰求項1 50 ノグリカン結合ポリアクリルアミドゲルを担体としてゲ

http://www4.ipdl.ncipi.go.jp/ticontentdben.ipdl?N0000=21&N0400=im... 2005-03-28

(3)

特開平8-85704

ル電気泳動に付し、泳動後の担体を酵素反応条件下にお いてインキュベートし、次いで、担体に結合固定されて いたグリコサミノグリカンの分解を検出し、検体中のグ リコサミノグリカン分解酵素の分別及び性質の同定を行 うことを特徴とするグリコサミノグリカン分解酵素の分 则同定法。

【韻求項18】グリコサミノグリカンがヒアルロン酸、 コンドロイチン、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫 酸、ヘパリン、ケラタン硫酸及びヘパラン硫酸から選ば れることを特徴とする請求項17に記載の同定法。

【発明の詳細な説明】

[0001]

【発明の属する技術分野】本発明は、グリコサミノグリ カンの還元末端鏡にアミノアルキル結合または酸アミド 結合によりアリル化合物を結合したグリコサミノグリカ ンの新規誘導体に関するものであり、また、この新規誘 導体とアクリルアミドを共重合させたグリコサミノグリ カンが結合したポリアクリルアミドゲル並びにこのポリ アクリルアミドゲルをゲル電気泳動用担体として使用 するものである.

[0002]

【従来の技術】従来、グリコサミノグリカンの還元末鑑 糖のヘミアセタール及びそれを活性化したものに、種々 の物質、例えば蛋白質、維脂質或いは脂質等を結合させ たグリコサミノグリカン結合物質が知られ、医薬品とし てその用途が開発されている(特関平3-284698. 国際公 関番号 WC92/01720)。また、グリコサミノグリカンの 僅かな置的変化、微細模造の変化は細菌やウイルス感染 及び癌や遺伝病等との関係で注目されてきており、これ、30 ちの変化は細胞、組織及び体液中に微量存在するグリコ サミノグリカン分解酵素に依存することが多く、これら の酵素を測定することは従来から重要視されてきた。

【0003】グリコシダーゼ測定法のように単盤やオリ ゴ艦に発色化合物や質光化合物を結合させた基質を使用 し、酵素により消化された時に、発色(蛍光)したり消 失したりする速度や様子を測定する方法は、グリコサミ ノグリカン分解酵素を測定する方法としては不適当であ る。そこで従来は、グリコサミノグリカンを基質として 生じた二糖やオリゴ糖を測定したり、分子量の低下で測 40 定してきた。また、蛋白分解酵素等をゲル電気泳動で測 定する方法として、ゲル中に基質を均一に坦め込んで酵 素を電気泳動し、その後、基質を消化させた後に基質の 稍失を測定する方法 (Zymography) があるが、この際、 使用する基質は高分子化合物に限定され、それは低分子 だと芸質そのものが弥動されゲル中から流れてしまうか **らである。しかもこれらの方法は操作が煩雑で、感度が** 低く再現性に問題があり、基質も限定される欠点があっ tc.

[0004]

【発明が解決しようとする課題】本発明は、上記欠点の **急いグリコサミノグリカン分解酵素の同定法を提供する** ものであり、そのための基質として有用な新規なグリコ サミノグリカン誘導体並びにこの新規誘導体とアクリル アミドとの共重合体からなる電気泳動用ゲル担体をも提 供するものである。

[0005]

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記問題 点に鑑みて微量のグリコサミノグリカン分解酵素を容易 10 に、確実に高感度に測定すべく鋭意検討した結果、本発 明に達した。即ち、本発明は、1)グリコサミノグリカン の還元末蟾藉を還元及び部分酸化することにより形成し たアルデヒド芸、または該還元末總體を酸化及び脱水閉 躁することにより形成したラクトンと、アミノアルキル 結合または酸アミド結合により末端にアリル基を有する 化合物が結合しているグリコサミノグリカン誘導体、も しくは該アルデヒド基または該ラクトンに、少なくとも 2個のアミノ墓を有するスペーサー化合物をアミノアル キル結合または酸アミド結合させ、末端がアリル甚で、 し、グリコサミノグリカン分解酵素を同定する方法に関 20 他端がアミノ基と結合し得る官能基であり、結合鎖中に 異種原子を含有していても良い炭化水素化合物を、該ス ペーサー化合物のアミノ甚に結合させてなるグリコサミ ノグリカン誘導体、2)該グリコサミノグリカン誘導体及 びアクリルアミドを構成単重体として含む共量合体から なるグリコサミノグリカン結合ポリアクリルアミドゲル 並びに3)グリコサミノグリカン分解酵素含有検体を、上 記グリコサミノグリカン結合ポリアクリルアミドゲルを 担体としてゲル電気泳動に付し、泳助後の担体を酵素反 応条件下においてインキュベートし、次いで、担体に結 台固定されていたグリコサミノグリカンの分解を検出 し、 検体中のグリコサミノグリカン分解酵素の分別及び 性質の同定を行うことよりなるグリコサミノグリカン分 解酵素の分別同定法を要旨とするものである。

[0006]

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。 本発明で使用し得るグリコサミノグリカンは特に制限さ れず、その目的に応じて適宜選ばれる。具体的には、例 えばコンドロイチン、コンドロイチン硫酸、ヒアルロン 酸、デルマタン硫酸、ヘパリン、ヘパラン硫酸、ケラタ ン鞣酸、ケラトポリ硫酸等が挙げられるが、これらの 中、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸、ヘパリン、 ケラタン硫酸、ヘパラン硫酸が好ましく、特にコンドロ イチン硫酸が好ましい。

【0007】グリコサミノグリカンの還元末總體を還元 し、次いで部分酸化することによりアルデヒド基を形成 するがその方法は、例えば特闘平3-284698号公報に記載 されているような公知の方法を適宜採用することができ る。その際、還元反応は、還元剤として、グリコサミノ グリカン1モルに対して5~50当量、好ましくは10 50 ~20当畳の水素化ホウ素ナトリウム。シアノ水素化ホ

特開平8-85704

ウ素ナトリウムなどの水素化ホウ素アルカリ塩を用い て、ホウ酸塩緩衡液(pH8.3)、リン酸塩緩衡液(p H8.6) 等の経質液と、ジメチルホルムアミド、アセト ニトリル等の有機溶媒との混合溶液中、()~4()*C好ま しくは15~20℃で一晩おこなわれる。また、引き続 き行われる酸化反応は、酸化剤として、上起還元反応生 成物1モルに対して1~30当量、好ましくは5~10 当量の過ヨウ素酸ナトリウム、過ヨウ素酸カリウムなど の過ヨウ素酸アルカリ塩を使用し、0~20℃ 好まし くは0~5 ℃で行われる。

【0008】また、グリコサミノグリカンの還元末總糖 を酸化し、ついで脱水関環することによりラクトンを形 成する方法も上記公報に記載されている方法を準用する ことができる。具体的には、まず、遠元末端糖部分を酸 化して開裂するが、この酸化反応には酸化剤として、グ リコサミノグリカン1モルに対して2~20当量、好ま しくは5~15当畳のヨウ素、臭素等を用い、上記した ような溶液中、0~40℃、好ましくは15~20℃で 行われる。このようにして生成した酸化生成物を酸で処 ックス50(商品名:ダウ・ケミカル社)、アンバーラ イト【R120(商品名;ローム・アンド・ハース社) のような強酸性陽イオン交換樹脂が使用される。

【0009】とのようにして還元末端鏡を活性化したグ リコサミノグリカンのアルデヒド基或いはラクトンに、 少なくとも2個のアミノ量を有するスペーサー化合物を 反応させるが、スペーサー化合物は、次の一般式 (1) で示される。

. (1) 【化3】NH₂-Y-NH₂ (式中、Yは、- [(CH₂),- (CHR),]-、-(CH₂)_x-CH(COOH)-、フェニレン苗、ナフ チレン基を表し、R=H、炭素数1~4のアルキル基、 x=3または4. m=1~10、n=1~10. 但しm +n≤10を意味する。)。これらの化合物の具体例と しては、エチレンジアミン、1,3-プロパンジアミン (トリメチレンジアミン)、1、4-ブタンジアミン (テトラメチレンジアミン:プトレツシン)、1、6-ヘキサンジアミン (ヘキサメチレンジアミン). 1, 6 -ジアミノ-2-エチルヘキサン等のα、ω-アルキレ ミノナフタレン、1,5-ジアミノナフタレン、2,7 ージアミノナフタレン等の芳香族ジアミン、リジン、オ ルニチン等の塩基性アミノ酸が挙げられるが、とれらの うちα、ωーアルキレンジアミンが好ましく、特にエチ レンジアミンが好ましい。

【0010】アルデヒド芸との反応は、それ自体公知の 虚元アミノ化反応により実施することができる。すなわ ち、アルデヒド基とアミノ基を反応させてシッフ塩基を 形成させ、これを還元してアミノアルキル(-CH,N

用いたのと同様な密媒中、酸化処理したグリコサミノグ リカンに約150モル当量のジアミノ化合物を15~6 0℃で数十分~数十時間、好ましくは約5時間反応さ せ、それと同時またはその後に、例えばシアノ水素化ホ ウ素ナトリウム、水素化ポウ素ナトリウム、揮発性のボ ランコンプレックス (例) ボランジメチルアミンコンプ レックス、ボラントリエチルアミンコンプレックス、ボ ランピリジンコンプレックス等)のような虚元剤を用い て還元することにより行われる。虚元剤の使用量は上記 反応に使用するグルコサミノグリカンのモル数の10~ 100倍モル量である。また、ラクトンとの反応は、ラ クトンをトリアルキルアミン塩としてジアミノ化合物と 反応させるか、ラクトンとジアミノ化合物との混合液を 水酸化ナトリウム水溶液等のアルカリを用いてpHを4 ~7にした後、0~70℃、好ましくは15~50℃で 反応させることによって酸アミド結合を形成させること ができる。

【0011】ついで、このようにして生成したアミノ化 グリコサミノグリカンの遊艇のアミノ芸に、末端がアリ 理し段水閉環するが、酸としては固体酸、例えばダウエ 20 ル基で、他鑑がアミノ基と結合し得る官能基であり、結 台鎖中にO、S、NHなどの異種原子を含有していても 良い炭化水素化合物、好ましくは鎖状炭化水素化合物、 より好ましくは徐伏炭化水素化合物(以下、アミノ基反 応性アリル化合物ということもある) を反応させ、アリ ル基合有グリコサミノグリカン誘導体を合成する。アミ ノ華と結合し得る官能基としては、アミノ基に対し反応 活性を有する基であれば良く、例えばエポキシ基。ハロ ゲン原子、ヒドロキシル基。カルボキシル基等がある が、反応性、副生成物等の点でエポキン基が好ましい。 30 エポキシ基とアリル基を育する化合物としては、アリル 基を有するアルコール領にエピクロロヒドリンを反応さ せて得られる化合物があるが、最も好ましいのは、アリ ルグリシジルエーテル (アリル2、3-エポキシブロビ ルエーテル)である。反応は約1600モル当量のアリ ルグリシジルエーテルを用いて、水性溶媒、例えば水と 炭素数1~4の低級アルコールからなる混合溶媒中、数 十分~数十時間、好ましくは1~数時間、0~70℃、 好ましくは15~50℃で実施される。上記のように、 還元末端緒を活性化したグリコサミノグリカンとジアミ ンジアミン、1、4-ジアミノベンゼン、1,4-ジア 40 ン化合物を反応させた後、アミノ基反応性アリル化合物 を反応させてアリル基含有グリコサミノグリカン誘導体 を合成する代わりに、このような活性化グリコサミノグ リカンとアリルアミン、N-アリルチオウレア、N-ア リルウレアのような末端がアリル基で他端がアミノ基で ある化合物を反応させてアリル基含有グリコサミノグリ カン誘導体を合成することができる。反応条件は、予備 **実験によって当業者であれば容易に決定できる。**

【0012】生成した目的化合物は、反応終了後の反応 液から、アルコール等により沈澱・分能した後、透析、 H-) 結合とすることができる。たとえば、前記反応に 50 イオン交換クロマト等の公知の精製法により精製し、減

http://www4.ipdl.ncipi.go.jp/tjcontentdben.ipdl?N0000=21&N0400=im... 2005-03-28

(5)

特開平8-85704

圧下凌縮乾燥する。上記合成方法に従い、グリコサミノ グリカンにエチレンジアミンを介してアリルグリンジル エーテルを結合させた生成物は、下記の一般式(2)で*

*示される。 [0013] [{{44}}

GAG—R'—NHCH2CH2NHCH2CH OH

. (2)

(式中、GAG-R -は、還元末端が修飾されたグリ コサミノグリカン残基を表し、R はCH」またはCO を表す。}

【0014】本発明では、上記の方法で得られるアリル 基を含有するグリコサミノグリカン誘導体を用いてゲル 電気泳動用の狙体を合成する。担体の合成は、従来のボ リアクリルアミドゲルを調製する方法に進じて行うこと ができる。即ち、アクリルアミドとN、N ーメチレン ビスアクリルアミド (Bis) を含む水溶液にアリル基含 有グリコサミノグリカン誘導体を加えて、例えば冷暗所 に一昼夜置くなどして均一に混合し、これを重合開始 剤、例えば過硫酸塩、過酸化ベンゾイル等の過酸化物、 アゾビスイソブチロニトリル等のアゾ化合物や酸化剤と **运元剤よりなるレドックス開始剤を用いて重合する。ま** た、重合促造剤として、N.N.N'.N'ーテトラメチルエチ レンジアミン (TBMED) を添加してもよい。 アクリル アミドに対するN、N°-メチレンピスアクリルアミド の使用置は、一般のポリアクリルアミドゲルに使用され ている程度であり、アリル甚含有グリコサミノグリカン 誘導体の使用量は、基質のグリコサミノグリカンの種類 によっても異なるが、通常1~20µg/m1の範囲か **ら遺ばれる。また、宣合反応は、所望の大きさの担体に** 適したセル中で行う。

【0015】本発明においては、このようにして合成し たグリコサミノグリカン結合ポリアクリルアミドゲルを 担体として使用し、微量のグリコサミノグリカン分解酵 素を該分解酵素が基質を分解しない条件で電気泳動する が、泳動用経順液は、分解酵素や基質の種類により適宜 調整される。次いで、独動後の担体を必要に応じて経管 液等で洗浄した後、分解酵素の反応条件下に置くが、反 応条件は分解酵素の種類を考慮して、緩衝液の種類、p H. 温度、時間等を適宜遺定してきめられる。酵素反応 後の狙体を、アルシャンブルーやトルイジンブルー等の 40 発色試薬で発色させる。分解酵素がポリアクリルアミド ゲルに結合固定した基質を分解すると、分解された部分 のみが発色せず白く抜けて検出されるので、これにより 分解酵素の活性を同定するととができる。

【0016】 このようにしてグリコサミノグリカンの役 領を変えたゲル担体を合成し、この担体を用いて酵素を 電気泳動させれば、基質特異性の異なるグリコサミノグ リカン分解酵素を容易に分別または同定することがで き、しかも酵素が阻害物質や不純物等を含んだり、複数

でなく、分別や同定は容易、かつ確実で高感度である。 本発明方法は、グリコサミノグリカンとして、コンドロ 19 ーイチン、コンドロイチン硫酸、ヒアルロン酸、デルマタ ン硫酸、ヘパリン、ヘパラン硫酸、ケラタン硫酸を適用 することができるので、それぞれの分解酵素の分別や同 定に極めて有効な方法であり、特に従来のポリアクリル アミドゲルを用いる方法では、分別や同定出来なかった ヒアルロン酸よりも分子量が小さい。例えばコンドロイ チン臓酸のようなグリコサミノグリカンに対する分解酵 素を分別または同定できる利点を有している。

Я

[0017]

【発明の効果】本発明の新規なグリコサミノグリカン誘 導体は分子中にアリル基を有しているので、この誘導体 はアクリルアミドと容易に共産合しグリコサミノグリカ ンが結合した共重合体を提供することができる。そし て、この共重合体ゲルは、従来ポリアクリルアミドゲル による電気泳動では、分子量が比較的小さいために泳動 中に流動してしまいゲルに固定することが困難であった コンドロイチン硫酸のようなグリコサミノグリカンをゲ ル中に固定しているので、これを担体として使用するこ とにより、コンドロイチナーゼのようなグリコサミノグ リカン分解酵素の同定を可能にするのである。他の同定 30 可能なグリコサミノグリカン分解酵素としてはヘパリン 及びヘバラン確酸分解酵素、デルマタン硫酸分解酵素、 ケラタン硫酸分解酵素が挙げられる。また、本発明の共 重合体ゲルを用いて電気泳動することにより、酵素阻害 物質や不純物と酵素とを分離することができ、なおかつ 複数の分解酵素が含まれていても分解されるので、グリ コサミノグリカン分解酵素の高感度な検出、分別、同定 を容易に行うことができる。従って、グリコサミノグリ カンの種類を変えた共重合体ゲルを用いて、細胞組織、 体液及び血液等を洗動することにより新規酵素の発見が 期待され、また従来見いだせなかった酵素アイソマーの 検出、分別、同定が可能になり、疾患や炎症等との関係 が明らかにされる可能性が大である。

[0018]

【実施例】以下、本発明を具体的実施例により説明する が、本発明は、これら実施例に限定されるものではな

実施例1:コンドロイチン臓酸-アリル化合物の調製 コンドロイチン硫酸 (分子量20000) 4000mg(0.2mmol)を 40mlの50ml ホウ酸ナトリウム緩衝液(pH 8.3)に溶解 の分解酵素を含む場合でも適用することができるばかり 50 し、30.26mp(0.8mpol)の水素化ホウ素ナトリウムを加え

http://www4.ipdl.ncipi.go.ip/ticontentdben.ipdl?N0000=21&N0400=im...

2005-03-28

て室温で20時間反応した。反応液をpH 4.0に酢酸で調整 し、4°C下で水に対して遠折して凍結乾燥した。得られ た白色粉体が遠元末總轄還元物である。この還元末總轄 還元物(還元コンドロイチン硫酸(分子型20000)) 4000m q(0.2mmo1)を40m1の40ml イミダゾール塩酸塩(pH5.5)に 溶解し、過ヨウ素酸+トリウム171mg(0.8mmc1)を加えて,暗 所、OCで1時間反応した。生成した反応液を4°C下で水 に対して透析して凍結乾燥した。得られた白色粉体が虚 元末端糖限定敗化物でアメデヒド基を持っている(コンド ロイチン硫酸-アルデヒド)。

【0019】コンドロイチン硫酸-アルデヒド4000mg (G.2mmo1)を50m1の水に溶解し、2M エチレンジアミンを 15ml 加えた。15分後、1.26q {20mmol} のシアノ水素化 ホウ素ナトリウムを加えて室温で5時間反応した。189m q(5mmol)の水素化ホウ素ナトリウムを加えて1~4日間 反応した。生成した反応波を4°C下で水に対して透析し て原結乾燥した。得られた白色粉体はアミノ基を持って いる (アミノ化-コンドロイチン硫酸)。

アミノ化コンドロイチン硫酸の純度(グルコサミンを標 進としてニンヒドリン反応で定費): 95.2%

【0020】アミノ化-コンドロイチン硫酸 100meを 水2mlに溶解し1mlのエタノールを加えて、1mlのアリル グリンジルエーテル (アリル2, 3-エポキシプロピル エーテル〉を加えて40℃で2時間反応した。反応液を4 ℃下で水に対して透析し炭結乾燥した。得られた白色粉 体がコンドロイチン硫酸-アリル化合物である。収置は 98mgであった。得られたコンドロイチン硫酸-アリル化 台物の純度(アリル基の含量をNARでコンドロイチン議 酸のN-アセチル基のプロトン(2ppm)とアリル基の3 個のプロトン(5~6ppm)の比から計算)は、95.3%であ 30 った。この化合物の旋光度は、-25.16(1% H_c0)あり、 i Rスペクトルを図1に示す。

【0021】実施例2:コンドロイチン硫酸(分子置200 00)25gを水2509m1に溶解し、ヨウ素5gのメタノール溶液 2500mlを加えて20時間反応した。反応液を減圧下途縮し て(滅縮後305ml)エタノールを加えて白色沈澱物 (還元 末端循環元物)を得た。これを19ット4の水に溶解しどかユフ 1350(H)10vh4に通過させ、酸性画分を得た。この酸性 回分を減圧下渡縮し(渡縮後500ml), ジメチルフォルムアミド(DM F) 509mlを加えて再度濃縮した。この操作を 廻以上線 *49

10

て、コンドロイチン硫酸の還元末端ラクトンを得た。こ のコンドロイチン硫酸ラクトンのDMF溶液(4000mg/50m 1) にエチレンジアミン1、8gを加えて反応した。 反応波 を水に対して逐折して凍結乾燥した。得られた白色粉体 がアミノ化-コンドロイチン硫酸である. アミノ化コンドロイチン硫酸の純度:94,7% アミノ化コンドロイチン硫酸100mgを実施例1に進じて アリルグリシジルエーテルと反応した。その収量は、9 10 6.7mgであった。

*り返してDMP溶液を得た。その後、4°Cで20時間放置し

コンドロイチン薩酸 - アリル化合物の純度: 95.0% 旋光度:-25.0(1% H_eO)

【0022】夷鎚例3 ヘバリンーアリル化合物の調製 ヘバリン (分子量3500) 700mg(0,2mmol)を使用して実施 例1に準じてアミノ化へパリンを調製した。その収置は 642mgであった。

アミノ化へパリンの純度:90.3%

アミノ化へパリン100mgを使用して、実施例1に進じて ヘパリンーアリル化合物を調製した。収置は、89.9mgで 20 あった。

ヘパリン-アリル化合物の純度:90.0%

旋光度:43.2(1% H_cO)

ヘパリンーアリル化合物の IR スペクトルを図2に示

【0023】実施例4

一般的に使用されているポリアクリルアミドゲル電気泳 動を行う装置を準備し、1mm の厚さで以下の(a)。 (b)、(c)の3種類の組成から順次構成されているゲル担 体を2個作成した。第1のゲルは (a) は8.0% ポリアク リルアミドゲル、(b)はコンドロイチン硫酸(8.5μ q/ml) を(a)に均一に含有させたポリアクリルアミドゲル、(c) は12、5%ポリアクリルアミドゲルで構成した。第2のゲ ルは、(a) は8.0%ポリアクリルアミドゲル。(b) は (a)にコンドロイチン硫酸-アリル化合物 (実施例1で合 成) 8.5μ q/mlになるように含有させたポリアクリルア ミドゲル、(c)は12、5%ポリアクリルアミドゲル で構 成した。

【0024】ギリアケリレアミドゲルを作成するゲル溶液及び泳 動溶媒は下記に示す通りである。

200ml

14.17		
30%	アクリムアミドストック溶液	(m)
水 (m1}	

10%AP5 (ml)

TEMED (#1)

【0025】30約79127計 ストック溶液 アナリルアミト

N.N'-メチレンビ スフォリシアミト 2q

10XTEE (m))

8.0% 12.5% 8.0 12.5 18.8 14.8 3.0 3.0 0.15 0.15 5.0 5.0 水

9799D731 4 D (%)

塗過して4℃保存(数+月)

50 10% APS(過硫酸アンモニウム)

(7)

特開平8-85704

11

過磁酸でパークム n da * 4m)

用時調製

弥駒用パッファ (10XTBE buffer)

川以 (粉体) 108a ホウ酸 55a EDTA-2Na 9.3a 水 1000ml

室温保存

使用時、水で10倍希釈する。

TEMED:N,N,N',N'-ケトラメチレンティスン(Tetramethylethylen (enrms ibe

【0026】室温で、20mA、100分電気泳動した各々の4° ルを2.5%が3イトンX-100で室温で洗浄した後。0.5%がカナル-を含む20%エタノール/10%的酸で染色した。第1のゲル における単に混合したコンドロイチン硫酸は染色されな かった。本発明の第2のゲルの(b)の部分は明白に染 色された。これにより、単にゲルに混合したコンドロイ チン硫酸は採動中に流出し、本発明のゲルでは、コンド れていることが判明する。

【0027】 実施例5 コンド dイチナーゼ ABOの検出限界 本発明のコンドロイチン硫酸-アリム化合物 (実施例1で合成) を使用して調製した8.0% 『アアヤリムアミド 電気泳動用ゲム(こ こでは、実施例4に記載した8.0%# ウァクリムアミドダムを作成 するゲル溶液に、終濃度0.1%ドデシル硫酸ナトリウム(S DS)を加えた) にエンドロイチナービABC (proteus vulgaris 由 来, 生化学工業(株)製)の畳を変えて付し、泳動用総 筒波に終滤度0.1%SDSを加えたこと以外は実施例4に 準じて電気泳動した。20mAで電気泳動したゲルを、 2. 5%トライトンX-100で1時間、窒温で洗浄し た。その後、0.15M NaClを含む50mMクエン酸-Na,HPO。 緩衝波 (pH6.0) 中で37℃、16時間インキュベート することによって、酵素反応を進行させた。その後、0、 ing/mlプロナーゼ (Streptomyces griseus由来、 Calbiochem社製)を含む20mih リスー塩酸穀筒液(pH 8.0) 中で、37℃、2時間インキュベートした。その 後、20%エタノール/10%酢酸で20分間インキュベート し、0.5%アルシャンブルーを含む20%エタノール/10%酢 敵で1時間インキュベートして染色した。その後、20% 49 示す。 エタノール/10分段中でインキュベートすることによ って余分なアルシャンブルーを除いた。図3の1~7は下 記に示す畳である.

1:250 # 11

2:200

3:175

4:125

5: 75

6: 50 7: 25

ここで、1 Uとは、p H8.0、3 7 ℃で1 分間にコンド ロイチン8 - 確酸から 1 µ m o ! の不飽和二糖を生成す る酵素量のことである。この結果, 25μ Uまで検出でき ることが明らかであり、高感度で測定可能である。

12

【0028】実施例6 デルマタン確酸-アリル化合物 の調製

デルマタン硫酸 (分子畳15000) 15g (1mmol)を使用して 真餡例1に進じてアミノ化デルマタン硫酸を顕製した。 その収置は15gであった。

10 アミノ化デルマタン硫酸の純度:95.2%

アミノ化デルマタン硫酸100mgを使用して、実施例1に 進じてデルマタン硫酸-アリル化合物を調製した。収置 は、98mgであった。

デルマタン硫酸-アリル化合物の純度:95.3% デルマタン硫酸-アリル化合物の!Rスペクトルを図4 に示す。

【0029】実施例7 ケラタン硫酸-アリル化合物の 調製

ケラタン硫酸 (分子置8000) 80mg(0.01mmol)を使用して ロイチン硫酸が確実にポリアクリルアミドゲルに固定さ 20 実施例1に進じてアミノ化ケラタン硫酸を調製した。そ の収量は80mgであった。

アミノ化ケラタン硫酸の純度:95.3%

アミノ化ケラタン硫酸80mgを使用して、実施例1に進じ てケラタン硫酸-アリル化合物を調製した。収量は、78 呵であった。

ケラタン硫酸-アリル化合物の純度:96.0% ケラタン硫酸-アリル化合物の1Rスペクトルを図5に 示す。

【0030】実施例8 ヘバラン硫酸-アリル化合物の 語談 30

ヘパラン硫酸(分子量20000)100mg(5μm3)を使用して **実施例1に進じてアミノ化へパラン硫酸を調製した。そ** の収量は100mgであった。

アミノ化へパラン硫酸の純度: 95.2%

アミノ化へパラン硫酸80mgを使用して、実施例1に準じ てヘバラン硫酸-アリル化合物を調製した。収量は、75 moであった。

ヘバラン硫酸 - アリル化合物の純度: 95.0% ヘパラン硫酸 - アリル化合物の i Rスペクトルを図6に

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明のコンドロイチン硫酸 - アリル化合物の IRスペクトル図

【図2】本発明のヘパリン-アリル化合物のIRスペク 上ル図

【図3】コンドロイチナーゼABCの電気挑動展開図

【図4】本発明のデルマタン硫酸-アリル化合物のIR スペクトル図

【図5】本発明のケラタン硫酸-アリル化合物のIRス 55 ベクトル図

【図6】本発明のヘパラン硫酸-アリル化合物のIRス* *ベクトル図 [図1] 3

20.00

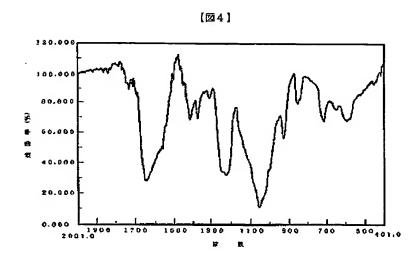
(8)

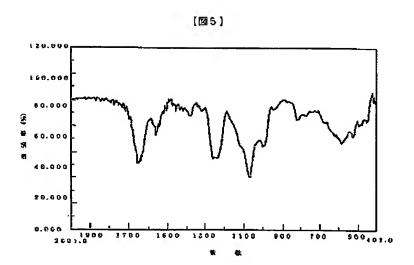
特開平8-85704 14

[2] ₹ 60.69 84 1400

(9)

特開平8-85704

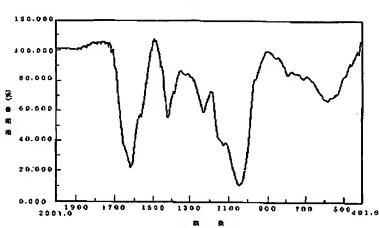




(10)

特開平8-85704





フロントページの続き

(51) Int.Cl.*		識別記号	庁内整理番号	FI	技術表示箇所
COSL	29/10	LG2			
	33/26	LJV			
C12Q	1/34		6807-4B		
	1/44		680? – 4B		
G01N	27/447				
//(C08L	33/26				
,	5:08)				
(C08L	33/26				
	5:10)				
(C08L	33/26			•	
	5:00}				